

УДК 576.893.195

УЛЬТРАСТРУКТУРА *STEMPELLIA DIAPTOMI*
(PROTOZOA: MICROSPORIDIA) С ПЕРЕСМОТРОМ
РОДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ВИДА

© В. Н. Воронин

Приведены сведения по ультратонкой организации микроспоридии *StemPELLIA diaptomi* из рачка *Diaptomus gracilis* Sars. На основании современных данных вид перенесен в род *Flabelliforma*.

Использование электронной микроскопии стало поворотным моментом в изучении микроспоридий. В ходе многочисленных исследований получены качественно новые данные об ультратонкой организации спор и особенностях спорогонии этих облигатных внутриклеточных паразитов, что в свою очередь привело к пересмотру таксономических критериев у микроспоридий от видового уровня и выше (Исси, 1986; Larsson, 1986; Sprague e. a., 1992). В результате описания микроспоридий, выполненные ранее на светооптическом уровне, уже не соответствуют современным требованиям. К видам, нуждающимся в переописании, относится и микроспоридия, выделенная из рачка *Diaptomus gracilis* и кратко описанная под названием *StemPELLIA diaptomi* (Воронин, 1977). Результаты изучения ультратонкой организации этого вида с пересмотром его родовой принадлежности в свете новых данных и составляет содержание настоящей статьи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ

Рачки *Diaptomus gracilis* Sars, зараженные *StemPELLIA diaptomi*, были отловлены в пелагиали оз. Врево Ленинградской обл. Зараженных особей выявляли путем просмотра живой планктонной пробы под стереомикроскопом МБС-1. Рачков с беловатым цветом тела отлавливали пипеткой и помещали по одному на предметное стекло. Их тело прокалывали препаровальной иглой и вытекшую гемолимфу микроскопировали. В случае обнаружения спор микроспоридий рачков сразу помещали в охлажденный 2.5 %-ный раствор глутаральдегида на какодилатном буфере, в котором хранили 24–48 ч при 5–6°. В лабораторных условиях материал дофиксировали 1 %-ным раствором OsO₄ в течение 2 ч, отмывали в чистом буфере, обезвоживали в восходящем ряду спиртов и ацетоне и заключали в эпон-аралдитовые блоки. Срезы изготавливали на ультрамикротоме LKB, контрастировали 3 ч в насыщенном водном растворе уранилацетата и 5 мин в цитрате свинца. Готовые срезы просматривали на электронном микроскопе JEM-100C.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Описание паразита на светооптическом уровне сделано ранее (Воронин, 1977, 1986), поэтому мы приводим лишь результаты электронно-микроскопических исследований. В изученном материале присутствовали стадии мерогонии и спорогонии (рис. 1, 2; см. вкл.).

Меронты (рис. 1, а). Меронты представлены 1–4-ядерными лентовидными клетками, в цитоплазме которых присутствуют многочисленные и равномерно распределенные рибосомы, а также шероховатый ретикулум. Последний расположен в 1–2 ряда между ядрами и 2–4 ряда – между ядрами плазматической мембраной (рис. 1, а). Ядра, лежащие цепочкой в цитоплазме, имеют максимальный диаметр 1.6 мкм. Их нуклеоплазма однородно гранулирована, скопления хроматина отмечены только вблизи ядерной оболочки. Ядра всегда лежат изолированно, диплокарионов не наблюдали. Деление меронтов бинарное (рис. 1, а).

Споронты (рис. 1, б, в). Отличительные черты споронтов: многоядерность и образование дополнительного слоя клеточной оболочки за счет отложения на плазмалемме электронноплотного секрета. Местами секрет был обильным и имел вид длинных извитых нитей (рис. 1, б). По сравнению с кариоплазмой меронтов кариоплазма споронтов менее электронноплотная, содержит крупные ядрышки. Рибосомы и шероховатый ретикулум остаются многочисленными. С увеличением числа ядер форма споронта изменяется с округлой на лопастевидную, а ядра мигрируют от центра к периферии клетки. Окончательное разделение спорогонального плазмодия на споробласты происходит по типу розетковидного почкования внутри спорофорного пузырька (рис. 1, в). Стенка спорофорного пузырька тонкая и плотно прилегает к споробластам, в результате чего полость спорофорного пузырька с многочисленными мелкими гранулами электронноплотного секрета небольшая (рис. 1, в). Оболочка спорофорного пузырька наблюдается только на ранних этапах спорогенеза и вокруг зрелых спор, как правило, отсутствует.

Споробласты. Молодые споробласты, образующиеся при распаде розеткоподобного спорогонального плазмодия уже имеют полностью сформированную экзоспору при отсутствии зачатков споровых органелл. Более зрелые свободно лежащие споробласты представляют собой клетки с деформированными стенками и электронноплотным содержимым. Стадии с хорошо развитыми внутриспоровыми органеллами отнесены к молодым спорам.

Споры. Живые споры имеют удлинено-овальную или грушевидную форму, с заостренным и несколько изогнутым передним концом (рис. 2, а). На округлом конце споры четко выделяется задняя вакуоль. Размер живых спор составляет $3.7 (3.3-4) \times 1.9 (1.8-2.1)$ мкм. Электронная микроскопия позволила выявить ряд характерных деталей в строении их органелл. Полярный пласт занимает около половины объема споры. Его передняя часть, примыкающая к якорному диску, состоит из редко лежащих пластин, а задняя – из плотно лежащих пластин (рис. 2, б). Якорный диск характерной грибовидной формы достигает в поперечнике 0.3 мкм (рис. 2, в). Полярный сак имеет длину около 0.5 мкм. Полярная трубка в зрелой споре делает 7–8 витков, которые различаются по толщине и внутреннему строению. Для первого витка, толщиной около 140 нм, был характерен центральный электронноплотный стержень, который у второго витка замещен на электроннопрозрачный стержень. Последующие 5–6 витков несколько тоньше двух предыдущих и значительно отличаются от них по внутреннему строению (рис. 2, г). Передние 2 витка всегда лежат в один ряд, в то время как последующие витки располагаются как в один, так и в два ряда. Подобные особенности строения полярной трубки позволяют охарактеризовать ее как гетерофилярную (Воронин, 1989).

Ядро одно и располагается в центре споры. Задняя вакуоль плохо выражена.

Стенка зрелой споры состоит из хорошо выраженных слоев: внутренней плазмалеммы, средней электронно-прозрачной эндоспоры и внешней экзоспоры. Эндоспора хорошо развита, ее максимальная толщина составляет около 60 нм, а минимальная (в области якорного диска) не превышает 40 нм (рис. 2, б). Экзоспора сравнительно толстая и многослойная. Внутренний электронноплотный слой экзоспоры толщиной около 15 нм в свою очередь состоит из трех тончайших электронноплотных слоев, разделенных двумя электронно-прозрачными слоями (рис. 2, г). Центральный электронно-прозрачный слой экзоспоры толщиной около 15 нм переходит в наружный гладкий электронноплотный слой. В целом вся толщина экзоспоры около 35–40 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно предварительному исследованию на светооптическом уровне микроспоридия из *Diaptomus gracilis* была определена как новый вид *Stempellia diaptomi* (Воронин, 1977). Электронно-микроскопическое изучение типового вида рода *Stempellia* – *S. mutabilis* Leger et Hesse, 1910 показало наличие у него двух типов спорогонии (Desportès, 1976). Повторное исследование микроспоридии *S. diaptomi*, выполненное нами на ультратонком уровне, выявило только один тип спорогонии, что служит основанием для исключения вида из рода *Stempellia*. Одновременно обнаружены и другие особенности этой микроспоридии, позволяющие более точно определить систематическое положение вида. К ним относятся: отсутствие диплокарионов на всем протяжении жизненного цикла, полиспоровая спорогония с делением споронта по типу розеткоподобного почкования при наличии спорофорного пузырька и совершенная организация споровых органелл. По этим признакам вид может быть отнесен к одному из двух недавно созданных родов: *Flabelliforma* (Canning e. a., 1991) или *Tardivesicula* (Larsson, Bylen, 1992). Сопоставление признаков этих двух монотипичных родов показывает их чрезвычайную близость (см. таблицу). Различия заключаются только в способе образования оболочки спорофорного пузырька и в форме спор. У *Flabelliforma* оболочка спорофорного пузырька тонкая и мембраноподобная, вначале плотно прилегает к поверхности споронта, а затем отделяется и сохраняется вокруг группы споробластов и спор. У *Tardivesicula* оболочка спорофорного пузырька формируется за счет blister-подобных выделений на поверхности споронта. При этом, несмотря на различия в способе образования оболочек спорофорного пузырька, она у обоих родов тонкая и непрочная. Сходно и внутреннее строение спор, хотя их форма у *Flabelliforma montans* овоидная, а у *Tardivesicula dublicata* – палочковидная. Таким образом, различия между этими двумя родами крайне незначительные, и поэтому создание второго рода *Tardivesicula* представляется весьма дискуссионным. Непростой задачей является определение родовой принадлежности описываемой здесь микроспоридии. Практически все ее признаки родового уровня совпадают с диагнозом рода *Flabelliforma* (см. таблицу). Единственное отличие заключается в числе спор, продуцируемых споронтом. Для *Flabelliforma* указывается переменное число спор, не превышающее 32. В нашем случае число спор также переменное, но только в пределах от 4 до 16. В систематике микроспоридий число спор, продуцируемых споронтом, является важным таксономическим признаком, имеющим уровень не ниже родового (Исси, 1986; Larsson, 1986). Однако в нашем случае этот диагностический признак сопровождается еще такой важной особенностью, как переменность в числе образуемых споронтами спор. В результате различие в максимальном числе спор у *Flabelliforma* (32) и у описываемой здесь микроспоридии (16) практически теряет свое принципиальное значение. На

Диагностические признаки у микроспоридий *Flabelliforma montana*
Canning, Killick-Kendrick et Killick-Kendrick, 1991, *Tardivesicula duplicata*
Larsson et Bylen, 1992 и *Flabelliforma diaptomi* (Voronin, 1977) comb. n.

Diagnostic characters of the microsporidia *Flabelliforma montana*,
Tardivesicula duplicata, *F. diaptomi*

Вид хозяина (класс, отряд)	Микроспоридии		
	<i>Flabelliforma montana</i>	<i>Tardivesicula duplicata</i>	<i>Flabelliforma diaptomi</i> comb. n.
	<i>Phlebotomus ariasi</i> (Insecta, Diptera)	<i>Limnophilus centralis</i> (Insecta, Trichoptera)	<i>Diaptomus gracilis</i> (Crustacea, Calanodia)
Локализация	Кишечник	Жировые клетки	Жировые клетки
Мерогония			
ядра	Изолированные	Изолированные	Изолированные
расположение	Соединенные	Цепочкой	Цепочкой
плазмодий	клетки		
деление	Бинарное и	Бинарное и	Бинарное и
	плазмотомия	плазмотомия	плазмотомия
Число мерозоитов	До 8	До 7	До 4
Оболочка вокруг мерозоитов	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Спорогония			
ядра	Изолированные	Изолированные	Изолированные
деление	Розеткоподобное	Розеткоподобное	Розеткоподобное
плазмодия	почкование	почкование	почкование
число споро- бластов	До 32	16–32	До 16
Спорофорная вакуоль			
оболочка	Тонкая и не- прочная	Тонкая и не- прочная	Тонкая и не- прочная
происхождение	Без blisterподоб- ной секреции	За счет blisterпо- добной секреции	За счет нитевиднопо- добной секреции
Спора			
форма	Овоидная	Палочковидная	Удлиненно-яйцевид- ная или грушевид- ная
число ядер	1	1	1
полярная трубка	Изофилярная, 4 витка	Изофилярная, 9–10 витков	Гетерофилярная, 7–8 витков
поляропласт	Пластинчатый	2-частный, пластинчатый	2-частный, пластинчатый
экзоспора	Не описана	Многослойная	Многослойная

основании этого мы считаем, что микроспоридия из диаптомуса не может служить основой для создания нового рода, а должна быть отнесена к существующему роду *Flabelliforma*. В связи с этим данный вид должен рассматриваться как *Flabelliforma diaptomi* (Voronin, 1977) comb. nova. Его краткое описание в сравнении с близкими к нему *Flabelliforma montana* и *Tardivesicula duplicata* приведено в таблице.

В заключение выражаю благодарность С. И. Метелеву и О. Ю. Соловьевой за техническую помощь в подготовке и проведении электронной микроскопии и Международному научному фонду (МНФ) за финансовую поддержку данного исследования.

Список литературы

- Воронин В. Н. Микроспоридии (Protozoa, Microsporidia) низших ракообразных из водоемов Ленинградской области // Паразитология. 1977. Т. 11, вып. 6. С. 505–512.
- Воронин В. Н. Микроспоридии ракообразных // Микроспоридии. Серия „Протозоология”. Вып. 10. Л.: Наука, 1986. С. 137–166.
- Воронин В. Н. Классификация полярных трубок микроспоридий на основе их ультратонкой организации // Цитология. 1989. Т. 31, № 9. С. 1010–1015.
- Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Микроспоридии. Серия „Протозоология”. Вып. 10. Л.: Наука, 1986. С. 6–136.
- Canning E. U., Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M. A new microsporidian parasite, *Flabelliforma montana* n. g., n. sp., infecting *Phlebotomus ariasi* (Diptera, Psychodidae) in France // J. Invertebr. Pathol. 1991. Vol. 57, N 1. P. 71–81.
- Desportes I. Ultrastructure de *Stempellia mutabilis* Leger et Hesse, Microsporidie parasite de l'éphémère *Ephemera vulgata* L. // Protistologica. 1976. T. 12, N 1. P. 121–150.
- Larsson J. I. R. Ultrastructure, function and classification of microsporidia // Progr. Protistol. 1986. Vol. 1. P. 325–390.
- Larsson J. I. R., Bylen E. K. C. *Tardivesicula duplicata* gen. et sp. nov. (Microspora, Duboscquiidae), a microsporidian parasite of the caddis fly *Limnephilus centralis* (Trichoptera, Limnephiliidae) in Sweden // Europ. J. Protistol. 1992. Vol. 28, N 1. P. 25–36.
- Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I. Taxonomy of Phylum Microspora // Clinical Rev. in Microbiol. 1992. Vol. 18, N 5/6. P. 285–395.

ГосНИОРХ, Санкт-Петербург,
190053

Поступила 30.01.1994

ULTRASTRUCTURE OF *STEMPELLIA DIAPTOMI* (PROTOZOA: MICROSPORIDIA) WITH THE REVISION OF GENERIC POSITION OF THE SPECIES

V. N. Voronin

Key words: microsporidium, ultrastructure, *Flabelliforma diaptomi* n. comb.

SUMMARY

The ultrastructure of *Stempellia diaptomi* Voronin, 1977, a parasite of the *Diaptomus gracilis* Sars (Crustacea, Calanoida) is described with emphasis on its systematic position. Nuclei are unpaired at all stages of the life cycle. Ribbon-like meronts lie in direct contact with the host cell cytoplasm, have 4–6 of nuclei and divide by binary fission or plasmotomy. The sporogonial plasmodium divide by a rosette-like budding, producing 6–16 sporoblasts. The sporophorous vesicle wall is fine, membrane-like and fragile. Vesicles with sporoblasts have small and polymorphic electron-dense inclusions. Fresh spores are elongate-ovoid or pyriform, measure $3.7 \pm 0.2 \times 1.9 \pm 0.2$ μ m. The polaroplast has two lamellar parts, where the anterior lamellae are the widest. The heterofilar (or slightly anisofilar) polar filament is arranged in 7–8 coils which are subdivided as (1–2) + 1 + (5–6). The exospore is layered. On the basis of the ultrastructural cytology the microsporidium is transferred from genus *Stempellia* to the genus *Flabelliforma*.

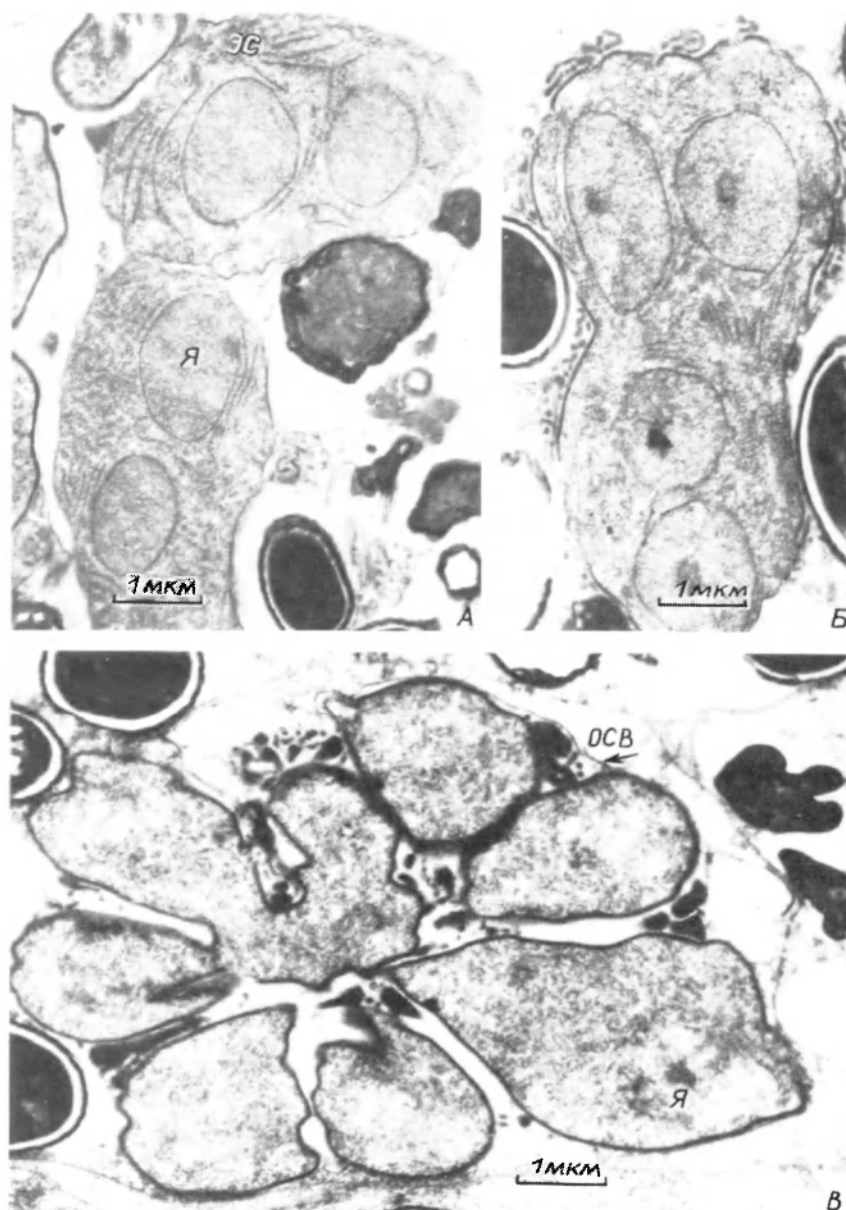


Рис. 1. Стадии мерогонии и спорогонии *Flabelliforma diaptomi* (Voronin, 1977) comb. n.
 а — меронты; б — ранний споронт, секретирующий электронноплотный материал; в — деление спорогонического плазмодия по типу розеткоподобного почкования; Я — ядро; ЭС — эндоплазматическая сеть; ОСВ — оболочка спорофорной вакуоли (стрелки).

Fig. 1. Merogonic (a) and sporogonic stages of *Flabelliforma diaptomi* (Voronin, 1977) comb. n.

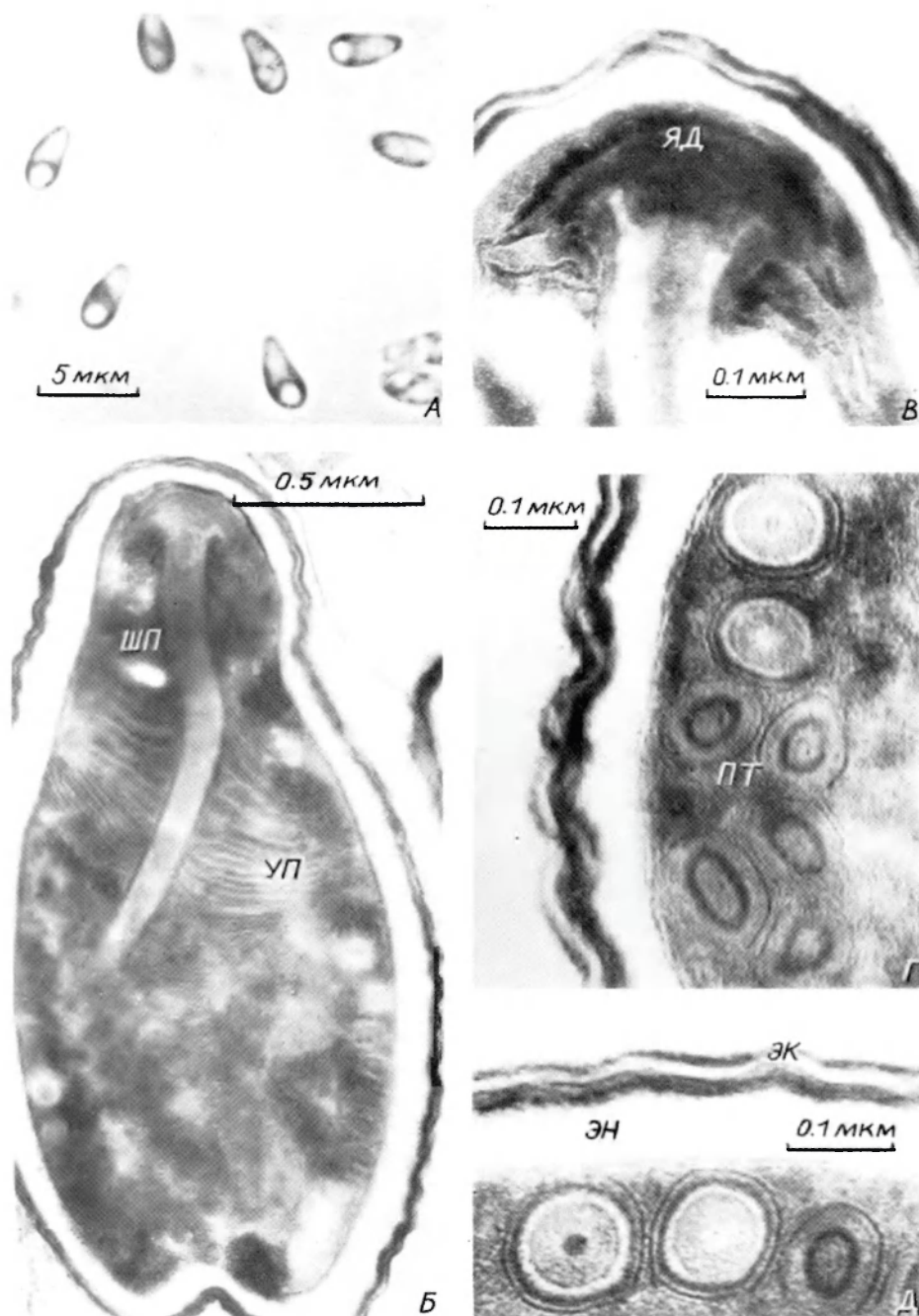


Рис. 2. Морфология спор *Flabelliforma diaptomi* (Voronin, 1977) comb. n.

a — живые споры; *б* — продольный ультратонкий срез споры; *в* — передний конец споры с якорным диском; *г* — поперечный срез 7 витков полярной трубки; *д* — строение передних витков полярной трубки и стенки споры; ЯД — якорный диск; ПТ — полярная трубка; ШП — широкопластинчатая часть поляропласта; УП — узкопластинчатая часть поляропласта; ЭН — эндоспора; ЭК — экзоспора.

Fig. 2. The spore morphology of *Flabelliforma diaptomi* (Voronin, 1977) comb. n. (Fig. 2, *a* — fresh spores).